

Alternatív mintavételi módszer gyakorlati alkalmazhatósága madárgenetikai vizsgálatokban: parlagi sasok ivarmeghatározása, mikroszatellitákon alapuló egyedi azonosítása és mtDNS-ének vizsgálata

N. Vili – M. B. Horváth –
Sz. Kovács – J. Chavko –
E. Hornung – L. Kalmár:

Alternative sampling methods
in avian genetic studies: sexing,
microsatellites based individual
identification and mtDNA
analyses of eastern imperial
eagles (*Aquila heliaca*)

Vili Nóra^{1*}, Horváth Márton B.²,
Kovács Szilvia³, Jozef Chavko⁴,
Hornung Erzsébet¹, Kalmár Lajos⁵

1] SZIE-ÁOTK, Ökológiai
Tanszék.

Rottenbiller u. 50.
H-1077 Budapest.

*E-mail:

Vili.Nora@aotk.szie.hu

2] Magyar Madártani és
Természetvédelmi Egyesület

3] SZIE-ÁOTK,
Biomatematikai és
Számítástechnikai Tanszék

4] Raptor Protection
Slovakia 1

5] MTA Szegedi Biológiai
Központ, Enzimológiai
Intézet

Összefoglalás. A szerzők az IsoCode STIX™ papírból és a tollakból történő mintavételi módszert hasonlították össze, a kárpát-medencei parlagi sas (*Aquila heliaca*) begyűjtött vedlett tollaiból és vérmintáiból végzett ivarmeghatározások, mikroszatellita fragmens-analízisek és mtDNS haplotípus meghatározások eredményeinek felhasználásával.

A munka során, magyarországi és szlovákiai parlagisas-territóriumokból, a madarak zavarása nélkül begyűjtött, 687 vedlett tollból, valamint 127, a szlovákiai fiókká gyűrűzésekor vett vérmintából történt DNS-kivonás. Mindkét mintavételi módszer hatékonynak bizonyult a genetikai vizsgálatokhoz, és a minták típusát tekintve (toll, ill. vér) gyakorlatilag nem volt különbség a DNS-kivonás (93,6%, ill. 98,4%) és az ivarmeghatározás (96,3%, ill. 98,4%) hatékonyságában. A mikroszatellitafragmensek meghatározása során a vérminták elemzésének 71,2%-a volt sikeres, míg a tollak esetében a szlovákiai mintákból lényegesen kisebb arányú volt a sikeres meghatározás (13,6%), mint a hasonló hazai mintáknál (100%), amelynek oka nagy valószínűséggel a tollak eltérő tárolási módjában kereshető. A mitokondriális DNS-szekvenciák elemzése során a megfelelően tárolt, vedlett tollakból származó minták nagyobb arányban bizonyultak használhatónak, mint a vérminták (sikereségi arány 82,6%, ill. 29,2%).

Mivel mindkét vizsgált módszer jelentősen leegyszerűsíti a terepi mintavételt, és eredményeik alapján mindkét eljárással megfelelő DNS nyerhető ki a különböző genetikai vizsgálatokhoz (az egyes meghatározások eredményességét azonban jelentősen befolyásolhatja a mintavétel módszere és a minták tárolási módja), lehetőség nyílik a fajtól (veszélyeztettség, kezelhetőség), ill. a rendelkezésre álló anyagi lehetőségektől függően választani a két módszer közt.

Summary. In addition to conservation biological genetic studies, there is a growing need for the verification of the origin of animals and animal products. Sample collection is a serious problem in the case of wild, endangered or stress sensitive species. Non-invasive techniques are required by most of these species (shed hair, feathers, and droppings), while invasive methods (e.g. blood samples) can be applied only occasionally, when the animals are handled because of other reasons (i.e. medical examination, ringing, cleaning the cages). The stress caused by the collection of blood samples can be reduced by using a process designed for taking small amounts of blood for genetic examinations. One of these methods is the use of the IsoCode STIX™ paper. In this study the authors compared

two sampling methods (shed feathers vs. IsoCode STIX™) based on the results of DNA extraction, genetic sexing, DNA profiling and mitochondrial DNA sequencing of eastern imperial eagles of the Carpathian basin.

In their study they examined the DNA extracted from 687 shed feathers (collected without disturbing the animals) and 127 blood samples collected from Slovakian eagle chicks during the ringing procedure. Both methods proved to be efficient enough to retrieve DNA in adequate quality and quantity for genetic analyses. They found no significant difference between the two types of samples (feather and blood) in the efficiency of DNA extraction (93.6% and 98.4%) and sexing procedures (96.3% and 98.4%). 71.2% of the blood samples yielded a correct DNA-profile, while the results from feathers differed significantly according to the origin of samples. Only 13.6% of the Slovakian feather samples gave a proper DNA-fingerprint, while this ratio was 100% among the Hungarian samples. This difference can most likely be explained by the different storage conditions of feathers. The properly stored Hungarian shed feathers proved to be more usable than the blood samples in the analyses of the mitochondrial DNA sequences (82.6% vs. 29.2%).

According to their results, both sampling methods (shed feathers and blood samples collected on special impregnated paper) provide appropriate DNA for genetic examinations, furthermore the sampling is much simpler, and the tests can be performed quickly and precisely, however the efficiency differed according to the type of analyses, the collection method and the storage conditions.

Genetikai vizsgálatokra a háziállatok és a veszélyeztetett állatfajok körében is szükség van

A természetvédelmi célú genetikai elemzések rutinszerűvé válása mellett az állatorvosi gyakorlatban is folyamatosan terjednek a molekuláris módszereken alapuló vizsgálatok. Bár a két terület célkitűzései eltérőek, mégis – a vizsgálatok jellegéből adódóan – hasonló technikai problémák és megoldások merülhetnek fel. A fajmegőrzési tevékenységben, vagy akár egy hosszú távú tenyésztési stratégia kidolgozásában rendkívül fontos az állományok genetikai állapotának pontos felmérése, hiszen a populáció szerkezete (génáramlás, metapopulációk, genetikai sodródás) alapvetően meghatározza a faj vagy fajta túlélési esélyeit (20). A genetikai vizsgálatok eredményei alapján minden korábbi, megfigyeléseken alapuló módszernél pontosabban becsülhetőek az állományok demográfiai sajátosságai (24), a be- és kivándorlás (18, 23) vagy az utódok ivararánya (24). Az így kapott adatok alapvetően befolyásolhatják egy veszélyeztetett faj védelmének stratégiáját (16, 25), ill. követhetővé válik a védelmi tevékenységek eredményessége (25). A felsoroltak mellett egyre nagyobb az igény a háziállatok (különösen az értékes tenyész- és haszonállatok) származásának pontos és megbízható bizonyítására is. Ebben a genetikai vizsgálatok nagy szerepet kaphatnak (2, 9).

Vadon élő, veszélyeztetett vagy stresszre érzékeny állatfajok esetében a vizsgálatokhoz szükséges mennyiségű és minőségű *DNS-minták begyűjtése* gyakran komoly gondot jelent.

A genetikai mintavételi módszereket három csoportba sorolhatjuk:

- destruktív mintavétel során a begyűjtött egyedek elpusztulnak;
- invazív mintavételhez szükséges az állatok befogása (pl. vér, nyálkahártya, biopszia);
- neminvazív mintavételnél az állatok által hátrahagyott nyomokat (vedlett toll, szőr, ürülék) használnak fel, amelyek az állatok befogása, zavarása nélkül is elérhetőek (26).

Az első két módszernél jó minőségű DNS-hez lehet jutni, ám az egyedek elpusztítása, károsodása, valamint a zavarásuk okozta stressz sok esetben nem fogadható el, továbbá a felhasználható minták száma is általában erősen korlátozott (26). Veszélyeztetett vagy stresszre különösen érzékeny fajoknál olyan esetekben van lehetőség invazív mintavételre (pl. vérvételre), amikor az egyedek egyébként is kézbe kerülnek (pl. fiókák gyűrűzése, állatorvosi vizsgálat, kezelés). A genetikai célú vizsgálatokhoz igen kis mennyiségű minta is elegendő, ezért a vérvétel okozta stressz tovább csökkenthető az IsoCode STIX™ kit segítségével. Az eljárásnál egyetlen csepp vérből, rövid idő alatt, egyszerű eljárással lehet megfelelő mennyiségű és jó minőségű DNS-mintához jutni, és a minta tárolása sem igényel külön

Az invazív mintavétel az állatok zavarásával, megfogásával jár

A levedlett toll könnyen gyűjthető, tárolása és szállítása egyszerű

A genetikai vizsgálatok alkalmasak – ivarmeghatározásra, – egyedazonosításra, – rokonsági fok és – leszármazás igazolására

felszerelést, mivel az, a papír száradása után, akár szobahőmérsékleten is, viszonylag hosszú ideig eltartható (8).

A genetikai vizsgálatokban nagy előrelépést jelentett a neminvazív mintavételi módszerek kifejlesztése (26). A mintaszám így jelentősen növelhető, hiszen nincs szükség a vizsgálandó egyed befogására, zavarására, ugyanakkor az így begyűjtött minták legtöbbször jelentősen rosszabb minőségűek. Ez megnöveli a vizsgálatra fordítandó költséget és időt (27). Megfelelő módszerrel a frissen begyűjtött és kezelt toll, szőr és ürülék általában jó minőségű genetikai mintát szolgáltat (15). Madarak esetén a neminvazív mintavételt megkönnyíti, hogy levedlett tollaik könnyen, komolyabb zavarás nélkül begyűjthetők (pl. a fészkelő- vagy pihenőhelyek terepi ellenőrzésekor, ill. fogságban a ketrecek takarításakor), tárolásuk nem igényel különleges körülményeket, valamint könnyen szállíthatók (akár postai úton is).

A genetikai vizsgálatok egyik gyakori típusa az *ivar meghatározása* (10, 14), hiszen számos madárfajnak nincs jól látható ivari dimorfizmusa. Az ivar pontos ismerete jelentős gazdasági előnyökkel is járhat az állattenyésztésben (29). Madaraknál a tojó a heterogametikus (WZ ivari kromoszómák) és a hím a homogametikus ivar (ZZ), így a W-kromoszómára specifikus szekvenciák kimutatása lehet egy lehetőség az ivarmeghatározásra. Az elmúlt évtizedben fedezték fel az első W-hez kötődő gént madarakban (CHD1W), ami a kromo-helikáz DNS-kötő fehérje kódolásáért felel, és a legtöbb fajra jellemző (13). A csak tojókra jellemző CHD1W génnek van egy mindkét ivarban megtalálható, Z-kromoszómához kötődő változata is. Ezek a gének az ivari kromoszómák rekombinálandó pszeudoautoszomális régióin kívül helyeződnek, így meglehetősen konzervatívak és alkalmasak az ivarok azonosítására (10).

További gyakori célja a genetikai vizsgálatoknak az *egyedek azonosítása*, nyomon követése, amely sok esetben nagyságrendekkel hatékonyabb lehet a mechanikai vagy vizuális jelöléseken alapuló azonosítási módszereknél. Az egyedekre jellemző DNS-profil (vagy DNS-ujjlenyomat) azonosításával és megismételt mintavétellel fontos ökológiai kérdésekre is válaszok adhatók (mint pl. a populáció mortalitási rátája, az egyedek pár- és territóriumhűsége), de az egyes egyedek rokoni kapcsolatai is ellenőrizhetőek (pl. állattenyésztői vagy állatorvosi gyakorlatban).

A mikroszatelliták a nukleáris DNS nem kódoló régióiban található, 2–6 bázispáros nukleotidisméltódések (5), amelyek szerepe a genomban még nem teljesen tisztázott. A DNS-polimeráz enzim, a rövid szakaszok nagyszámú ismétlődése miatt, gyakran ejt hibát ezeknek a szakaszoknak a másolásakor, így szelekciós nyomás hiányában a mikroszatellitákon nagymértékű polimorfizmus alakulhat ki. Több ilyen szakasz bázispárokból megadott hosszát vizsgálva, egyedre jellemző mintázatot kapunk, amely akár egyedi azonosítást is lehetővé tesz (DNS-profil) (5). Mivel a mikroszatellita-markerek erősen fajspecifikusak, ezen módszer esetében lényeges feltétel, hogy a vizsgálni kívánt faj genomjában kellő számú polimorf lokusz ismert legyen. Ez mára már a veszélyeztetett és a haszonállatfajok esetében legtöbbször rendelkezésre áll.

Egymástól *távolabbi rokonságban álló csoportok* (állományok, fajok, fajták) *összehasonlítására* alkalmas az anyai ágon öröklődő mitokondriális DNS (mtDNS) egyes szakaszainak vizsgálata. Az mtDNS másolásakor nincs replikációs javító rendszer, ezért mutációs rátája átlagosan nagyobb a nukleáris DNS kódoló szakaszainál, azonban a mikroszatelliták rátájánál kisebb (12, 17). A háziállatok eredetét (4, 22), ősi és őshonos *tenyésztett állatfajták leszármazását* is gyakran mtDNS-szakaszok vizsgálatával rekonstruálják (1, 6, 7). Az mtDNS vizsgálatán alapuló módszerek hatékonyságát általában növeli, hogy kópiaszáma a sejten belül nagyobb, mint a nukleáris DNS-nek, így kis mennyiségű vagy erősen károsodott mintából nagyobb eséllyel lehet a molekuláris genetikai vizsgálatokhoz megfelelő DNS-oldathoz jutni.

Saját vizsgálatok

Vizsgálatunkban a világszerte veszélyeztetett parlagi sas (*Aquila heliaca*) kárpát-mencei állományából begyűjtött vedlett tollakból, továbbá vérmintákból végzett ivar-



1. ábra. A tollcsévéből kivágott, vérrögöt tartalmazó felső köldök
Figure 1. The superior umbilicus, cut from the feather shaft, containing a blood clot

**Parlagi sasok fészkelő-
és pihenőhelyein
tollmintákat
gyűjtöttek**

**Gyűrűzéskor 127
fiókából vettek
vérmintát**

darak zavarásával. A parlagi sasok minden évben lecserélik tollazatuk egy részét, a július és szeptember közti költési időszakban szinte folyamatosan vedlenek. A kivedlett tollak, a földre kerülésüket követően néhány hónap alatt erősen degradálódnak, így a vizsgálatban felhasznált, gyengén vagy egyáltalán nem degradálódott tollakat legnagyobb valószínűséggel a begyűjtést megelőző néhány héten belül hullajtották el a madarak.

Genetikai vizsgálatokhoz a tollak felső köldöknek (superior umbilicus) nevezett részét távolítottuk el szikepengével, ahol a nagyobb tollak esetében szabad szemmel is látható vérrög található (**1. ábra**). Ez a vérrög a tollfejlődés során visszahúzódó kötőszövet maradványa, mivel az azt tápláló artéria itt lép át a tollcsévén. Az itt kialakuló zárványban lévő magas vörösvérsejtek általában megfelelő mennyiségű és minőségű DNS-t tartalmaznak a vizsgálatokhoz (15).

A preparálások során, a DNS-laboratóriumokban megszokott módon, nagy figyelmet fordítottunk a minták keresztszennyeződésének elkerülésére (15).

A szlovákiai fiókák gyűrűzésekor, a madarak szárnyvénájából pontszerű szűrást követően néhány csepp vért itattak fel egy speciálisan kialakított és impregnált szűrőpapírra (IsoCode STIX™), amely a gyűrűzéssel egyébként is járó stresszhatást valószínűleg nem növelte jelentős mértékben.

Valamennyi mintát $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on, fagyasztoóban tároltuk és általában egy hónapon belül megkezdtük a feldolgozásukat.

DNS-kivonás

A DNS-t módosított kisózásos módszerrel vontuk ki (11). A kivágott darabokat először Proteináz-K-s emésztésnek tettük ki: $30\ \mu\text{l}$ Proteináz-K enzim ($10\ \text{mg/ml}$), $15\ \mu\text{l}$ SDS (20% -os oldat), $100\ \mu\text{l}$ Proteináz-K puffer, $155\ \mu\text{l}$ víz és $10\ \mu\text{l}$ DTT ($1,4$ -ditio-treitol, $1\ \text{M}$). Az így kezelt minták, alapos keverés után, egész éjszakára $55\text{--}60\text{ }^{\circ}\text{C}$ -os vízfürdőbe kerültek.

A következő lépésben a felülúszóból a maradék peptideket $5\ \text{mol/l}$ koncentrációjú LiCl oldattal kicsaptuk, majd a tisztítás kloroform-izoamilalkoholos ($24:1$ arányú) kirázással folytatódott. A DNS-t tömény etanol hozzáadásával csaptuk ki, majd 70% -os etanolos rehidráció után megfelelő tárolóoldatban vettük fel (Tris-EDTA puffer) és fagyasztoóban tároltuk a további degradáció elkerülése érdekében. A kivont DNS mennyiségét és minőségét $0,8\%$ -os agarózgélén való futtatással ellenőriztük (**2. ábra**).

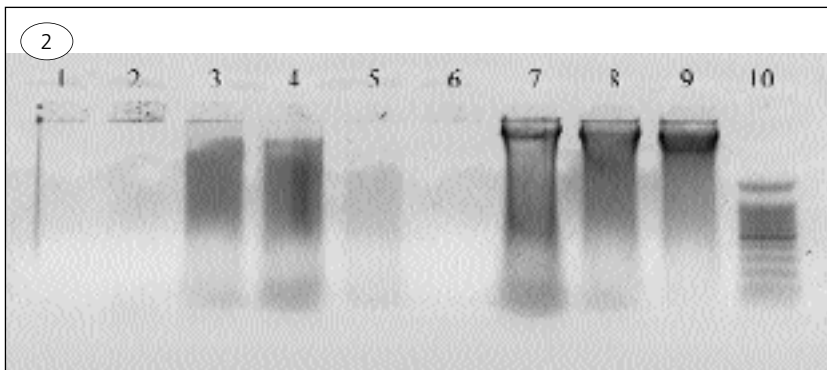
A szlovákiai fiókák vérmintái esetén az impregnált szűrőpapírhoz (IsoCode STIX™) a gyártó által mellékelte protokoll alapján jutottunk DNS-oldathoz.

meghatározások, mikroszatellita-fragmensanalízisek és mtDNS haplotípus meghatározások – használt módszerektől függő – eredményességét elemeztük.

Anyag és módszer

Mintavétel

A vizsgálathoz felhasznált, vedlett parlagisas-tollakat a magyar és a szlovák parlagisas-monitoring keretében végzett fészkelő- és pihenőhely-ellenőrzésekkor gyűjtöttük be. A fészkelőhelyek ellenőrzésére évente általában két alkalommal, a fiókák júniusi gyűrűzésekor, majd a kirepülést követően, augusztus–szeptember hónapokban került sor, így a minták begyűjtése nem járt a ma-

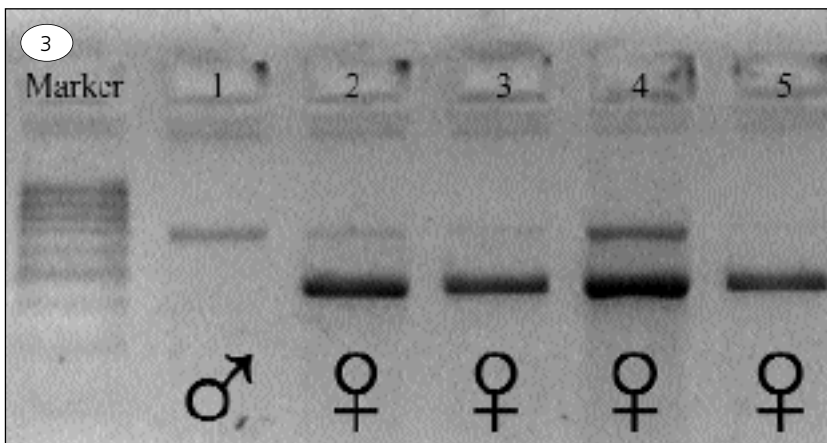


2. ábra. Különböző eredetű mintákból származó DNS-oldatok 0,8%-os agarózgélén futtatva

1, 2 – IsoCode STIX™-re vett vérminta, 3, 4 – vedlett toll felső köldökéből származó vérrögből vett minta, 5, 6 – a felső köldökből származó vérrög és a toll hegyének a felhasználásával készült minta, 7, 8, 9 – hagyományosan vett vérmintából származó DNS-oldat három különböző hígításban (125X, 25X, 1X), 10 – létra

Figure 2. DNA samples with different origins run on 0,8% agarose gel

1, 2 – blood samples stored on IsoCode STIX™, 3, 4 – samples from a blood clot of feathers, 5, 6 – samples from small feathers, including the blood clot and the feather tip, 7, 8, 9 – blood samples taken by conventional methods, in three different dilutions (125X, 25X, 1X), 10 – ladder



3. ábra. Az ivarmeghatározásra használt PCR-reakció végeredménye 2,5%-os agarózgélén, tollból származó mintákból

1 – hím, 2, 3, 4, 5 – tojó

Figure 3. Results of a sexing PCR-reaction from feather samples run on 2.5% agarose gel
1 – male, 2, 3, 4, 5 – female

pár hosszúságú konstans termék amplifikálható, míg tojóknál egy további 450 bázispár nagyságú szakasz készül a CHD1W génről (15). A génváltozatok, 250 bázispáros méretkülönbségüknek köszönhetően, agarózgélén futtatva, jól elkülöníthetőek (**3. ábra**).

A PCR beállításakor 15 µl térfogatban zajlott a reakció [7,5 µl PCR Master Mix (Promega), 1 µl GoTaq® polimeráz (0,5 U/µl, Promega), 1,5 µl MgCl₂ (25 mM, Promega), 3 µl primer mix (5 pmol/µl, 2550F/2718R) és 1 µl nukleázmentes víz (Promega)]. Az amplifikációs program touch-down PCR alapú, amelyben a kezdeti denaturálós lépés után (94 °C-on 5 percig) ciklusonként 1 °C-kal csökkentjük az annealációs hőmérsékletet (a kezdeti 60-ról 50 °C-ra, további 25 ciklusban az annealációs hőmérséklet ennyi maradt). Ezzel a módszerrel a PCR-reakció a kezdeti lépésekben erősen specifikus, azonban hatásfoka alacsony. Így kezdetben kevés, de specifikus PCR-termék képződik, amely már jóval hatékonyabban amplifikálódik a későbbi alacsonyabb annealációs hőmérsékletű ciklusok során.

Ivarmeghatározás

Vizsgálatunkban FRIDOLFSSON és ELLEGREN (10) által kidolgozott, allélspecifikus PCR alapú technikával dolgoztunk, amely a legtöbb madárfaj esetén sikerrel alkalmazható, megfelelően érzékeny és biztonságos módszer. A technika alapja, hogy olyan primereket alkalmazunk, amelyek eltérő méretű intronokat határoló szakaszokat erősítenek fel. A vizsgált madarak ivari kromoszómáin az általunk is használt 2550F/2718R (nem fajspecifikus) primerpár mindkét génváltozatot amplifikálja. Így nincs szükség utólagos enzimhasításra (29), és viszonylag gyorsan eredményhez lehet jutni, mivel ivartól függően egy (hímek), ill. két (tojók) PCR-termék keletkezik.

Az allélspecifikus PCR-módszerek hátránya azonban, hogy ha valamely okból (pl. rossz minőségű minta vagy gátlószer jelenléte) az egyik PCR-termékből egyáltalán nem vagy a kimutatáshoz nem elegendő mennyiség keletkezik, akkor az téves ivarhatározáshoz vezethet. A téves leolvasásból adódó hibát két ismert egyedről származó, azaz mindkét lehetséges eredményt adó („biztos tojó” és „biztos hím”) mintával küszöböltük ki.

A CHD1 génről irányuló allélspecifikus PCR eredményeképpen parlagi sas esetében mindkét nemnél mintegy 700 bázis-

Az ivarmeghatározáshoz PCR alapú technikát alkalmaztunk

Egyedi DNS-profil meghatározására di- és tetranukleotid lokuszokat használtak

Mikroszatellita fragmensanalízis

A parlagi sasnál eddig nyolc tetranukleotid polimorf lokuszt azonosítottak, ebből egy lokusz irodalmi adatok alapján monomorf, egy másik pedig a vizsgálat során, a PCR-optimalizáció ellenére, nem adott megbízható eredményt (3). Az ibériai sasnál (*Aquila adalberti*) tizenhét dinukleotid (19) mikroszatellita lokusz ismert, amelyek kivétel nélkül használhatóak parlagi sasoknál is.

Vizsgálatunkban fluoreszcens festékkel jelölt kilenc dinukleotid [HEX jelölés (sárga): Aa35, Aa36, Aa39; 6-FAM jelölés (kék): Aa02, Aa43, Aa56; TET jelölés (zöld): Aa49, Aa15, Aa27] és hat tetranukleotid (HEX: IEAAAG04, IEAAAG12, 6-FAM: IEAAAG11, IEAAAG13, TET: IEAAAG09, IEAAAG14) primerpárt használtunk. A tetranukleotid-ismétlődések vizsgálata technikailag egyszerűbbnek bizonyult, ugyanis a PCR-amplifikációnál, ezeken a szakaszokon, a polimeráz enzim kevesebbet téved és ennek megfelelően kevesebb a leolvasást nehezítő, aspecifikus termék (shadow band). Ezen okokból vizsgálatainkban nagyobb részt a tetranukleotid lokuszokat használtuk az egyedi DNS-profil megállapítására.

Az egyes lokuszok között minimális hosszbeli átfedés volt, így a különböző színekkel való jelölés után lehetővé vált multiplex PCR-ek alkalmazása, amely jelentősen csökkentette a vizsgálat anyag- és időigényét.

A dinukleotidszakaszok felerősítésére használt PCR-reakció 10 µl-ben zajlott MARTÍNEZ-CRUZ és mtsai (19) leírása alapján.

A tetranukleotid lokuszok esetén nem használtunk touch-down PCR-programot: kezdeti denaturáló lépés 94 °C-on 5 percig tartott, majd 30 cikluson keresztül 60 °C volt az annealációs hőmérséklet, végül 10 perces, 72 °C-os extenzió zárta a reakciót.

A fluoreszcensen jelölt PCR-termékek méretének pontos meghatározása automata kapilláris elektroforézis készüléken (ABI-310; Applied Biosystems) történt gyári méretmarker (Internal Lane Standard 600; Promega) és a GeneScan 3.7-es program segítségével.

A mitokondriális DNS kontrollrégiójának szekvenálása

Az mtDNS kontrollrégiójának szekvenálása során 31 egyed haplotípusát határoztuk meg a 13 polimorf hely segítségével. A 31 madár mintái magyarországi (16 egyed) és szlovákiai (1 egyed) fészkelőhelyeken, valamint a Hortobágyi Nemzeti Park Ragadozómadár Telepén (2 egyed) gyűjtött tollakból, továbbá szlovákiai fiókák (12 egyed) vérmintáiból származtak.

Az mtDNS kontrollrégiójának az AID1-Fbox primerpár (12, 20) által meghatározott, hipervariábilis részt tartalmazó, 345 bázispár hosszúságú szakaszát szekvenáltuk. A PCR-reakciót az ibériai sasra leírt és a parlagi sasnál is alkalmazott módszer alapján végeztük (20). A protokollt a saját igényeink és lehetőségeink szerint módosítottuk, a 40 µl-es PCR-reakció-térfogat a következő összetevőkből állt: 20 µl Promega PCR Master Mix, 2 µl MgCl₂ (25 mM; Promega), 14 µl nukleázmentes víz (Promega), 2 µl primer mix, (2 µl GoTaq[®] polimeráz (0,5 U/µl; Promega). Mivel a két primernek eltérő a TM (melting point) paramétere, a módszer hatékonyságát és megbízhatóságát a primerek eltérő arányú keverékének alkalmazásával növelni tudtuk. A program a tetranukleotid lokuszoknál használttól csupán az annealációs hőmérsékletben tér el (itt 55 °C). A PCR-reakció sikerességét 2,5%-os agarózgélben való futtatással ellenőriztük.

A PCR-terméket Montage PCR-tisztító filterrel (Millipore) tisztítottuk. A tisztított, amplifikált DNS-t tartalmazó mintákkal összeállítottuk a szekvenáló PCR-reakciót (2 µl tisztított PCR-termék, 1 µl BigDye Terminator Kit, 3.1; Applied Biosystem), 1 µl puffer és 1 µl forward, ill. a másik szál esetén reverz primer (5 pmol/µl)). A szekvenáló-PCR 30 ciklusból állt: kezdő denaturációs lépés 95 °C-on, annealáció 55 °C-on, extenziós lépés 60 °C-on. A PCR-termék tisztítása Multiscreen plate-en (Millipore) Sephadex G50 superfine gyöngy (Amersham) segítségével történt. A tisztított terméket 20 µl TSR-ben (template suppression reagent; Applied Biosystems) vettük fel, és a szekvenálás előtt 2 percig, 95 °C-on denaturáltuk. A szekvenálást automata fluoreszcens kapilláris-elektroforézissel végeztük ABI-310 típusú szekvenátoron, a szekvenációkat az ABI Prism Sequencing Analysis 3.3 programmal kaptuk meg.

19 madár haplotípusát tollmintából, 12-ét vérmintából határozták meg

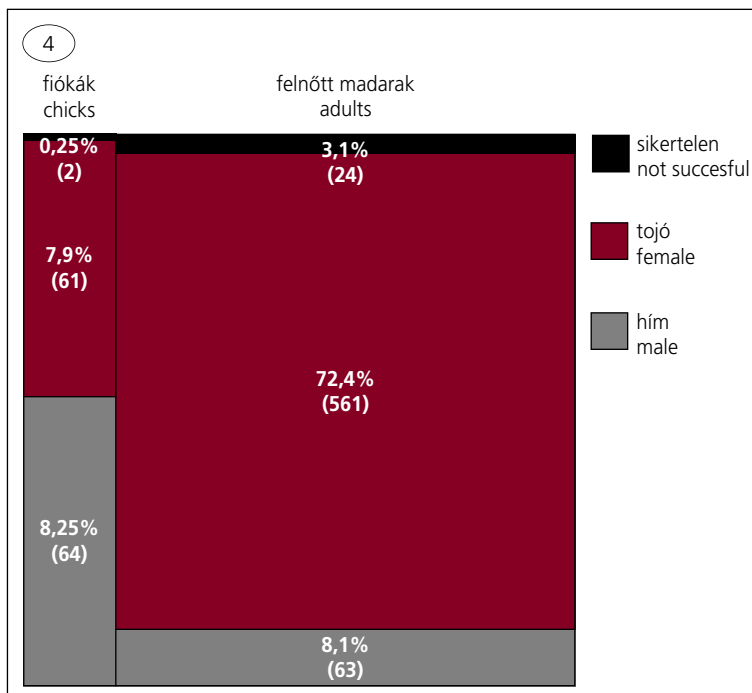
Táblázat. Az elvégzett genetikai vizsgálatok eredményessége a mintavételi módszerek és a származási országok szerinti felosztásban (HU: Magyarország, SK: Szlovákia)

Table. Results of the executed genetical analyses according to the applied sampling methods and country of origin (HU: Hungary, SK: Slovakia)

Mintatípus	Származás	DNS-kivonás		Ivarmeghatározás		Mikroszatellita fragmensanalízis		mtDNS-vizsgálat	
Sample type	Origin	DNA extraction		Sex determination		Microsatellite fragment analysis		mtDNA analysis	
		n	sikeresség (%)	n	sikeresség (%)	n	sikeresség (%)	n	sikeresség (%)
		n	success (%*)	n	success (%*)	n	success (%*)	n	success (%*)
Vedlett toll	HU	495	473 (95,5)	492	472 (95,9)	56	56 (100,0)	21	18 (85,7)
Shed feather	SK	192	170 (88,5)	156	152 (97,4)	44	6 (13,6)	2	1 (50,0)
	összes / all	687	643 (93,6)	648	624 (96,3)	100	62 (62)	23	19 (82,6)
Vérminta **	HU	–	–	–	–	–	–	–	–
Blood**	SK	127	125 (98,4)	127	125 (98,4)	118	84 (71,2)	41	12 (29,2)
	összes / all	127	125 (98,4)	127	125 (98,4)	118	84 (71,2)	41	12 (29,2)
Összes	HU	495	471 (95,7)	492	472 (95,9)	56	56 (100,0)	21	18 (85,4)
All	SK	319	295 (92,4)	283	277 (97,8)	162	90 (55,6)	43	13 (30,2)
	összes / all	814	768 (94,3)	775	749 (96,6)	218	146 (67,0)	64	31 (48,4)

* sikeres minta/összes feldolgozott minta (successful analyses/analysed samples)

** IsoCode STIX™ papírra vett minták (samples taken on IsoCode STIX™ paper)



4. ábra. Az ivarmeghatározások eredménye

A fiókáknál a várt 1:1-es ivararányt kaptuk, míg a felnőtt madaraknál a fészkek környékén begyűjtött tollak nagyobb része a tojóktól származott; az adatok az összes minta %-ában, zárójelben az esetszám

Figure 4. Results of the sexing procedures

We found 1:1 sex ratio among chicks, but there was a strong bias towards the females among the shed feather samples collected around the nest sites; data in percent of whole sample, number of samples in brackets

Eredmények

DNS-kivonás

A feldolgozott minták 94,3%-ából sikerült használható mennyiségű és minőségű DNS-hez jutni (táblázat). A DNS-kivonás hatékonysága alig különbözött a vedlett tollak (93,6%) és a szlovák fiókák vérmintái (98,4%) esetén. Ez alátámasztja mindkét módszer hatékonyságát, és az ilyen célú vizsgálatokban való alkalmazhatóságát.

Mindkét kivonási módszerrel hosszú távú tárolásra alkalmas minőségű és mennyiségű DNS-oldathoz jutottunk.

Ivarmeghatározás

A PCR-reakciók 96,6%-a adott értékelhető eredményt, és a hatékonyság közel azonos volt a vedlett tollak (96,3%) és a szlovák fiókák vérmintái (98,4%) esetén. A vizsgált vedlett-toll-minták esetében szignifikáns eltérés volt a tojóktól (89,9%), ill. a hímeiktől származó (10,1%) tollak arányában (binomiális próba, $p < 0,0001$). A vizsgált fiókák esetén a tojó-hím ivararány 61:64 volt, amely nem különbözött szignifikánsan az 1:1 ivararány-eloszlástól (binomiális próba, $p = 0,86$) (4. ábra).

Egyedi azonosítás

A mikroszatellita fragmensanalízisek során idáig 146 egyed teljes DNS-profilja készült el. 36 magyarországi madártól származó minta kilenc dinukleotid, míg 90 szlovák és 19 hazai minta hat tetranukleotid mikroszatellita fragmensanalízise alapján került elemzésre.

Hazai tollmintákból az egyedazonosítás mindig sikeres volt

A hazai tollminták esetén minden próbálkozás sikeres volt (100%), a szlovákiai mintáknál azonban lényegesen rosszabb arányt találtunk: 55,5%-ban kaptunk teljes eredményt (mintatípusonként tekintve a tollak 13,6%-a, a vérminták 71,2%-a adott teljes eredményt).

A fragmenshosszok alapján számolt PI-érték (*probability of identity*) adja meg annak a valószínűségét, hogy két véletlenszerűen kiválasztott egyed azonos genotípusú legyen. Az általunk használt tetranukleotid markerkészlet esetén a PI-érték 0,000301 volt, ami elég alacsony ahhoz, hogy a költő állomány méreteit (140–150 pár) figyelembe véve, egyedenkénti azonosításhoz használjuk a vizsgált lokuszokat (26, 28).

Mitokondriális DNS

A tollminták 82,6%-a, a fiókaminták 29,2%-a értékelhető eredményű volt. A kárpát-medencei populációban négy polimorf pozíciót és négy különböző haplotípust sikerült azonosítani: „E” (46%), „G” (12%), „K” (26%), „L” (16%). A négyből kettő újonnan felfedezett, még nem közölt haplotípus („K” és „L”). A kapott szekvenciák haplotípusát összehasonlítottuk az északnyugat-kazahsztáni, már publikált eredményekkel (14), ahol 20 madárból, öt polimorf pozíció alapján, négy haplotípust írtak le: „D” (50%), „E” (40%), „F” (5%) és „G” (5%). A haplotípus-(hd) és a nukleotid- (π) diverzitási indexek a kárpát-medencei populációban, a kazahsztánihoz képest, magasak voltak (hd: $0,71 \pm 0,051$, π : $0,00547 \pm 0,0004$) (21).

Következtetések

A gyűtött tollakban a DNS bomlását meg kell akadályozni

A szlovák mintáknál tapasztalt gyenge amplifikálhatóság alapján a *tollak tárolási módja* meghatározó lehet a vizsgálatok szempontjából, ugyanis a két csoport között csupán a mintavételt megelőző tárolásban volt különbség. A hazai tollakat minden esetben a gyűjtést követő lehető legrövidebb időn belül preparáltuk, és a kimetszett darabokat a feldolgozásig fagyasztozóban tároltuk. Ezt megelőzően sötét, hűvös helyen voltak, mivel az ultraibolya sugárzás, a magas hőmérséklet és páratartalom elősegíti a DNS bomlását. Ezzel szemben a szlovák tollak tárolásánál ezeket valószínűleg nem tartották szem előtt, így nem tudhatjuk, hogy milyen hatások érték a tollakban található DNS-t.

A felnőtt egyedeknél jelentős eltérést tapasztaltunk az 1:1 *ivararánytól*, amelynek az a magyarázata, hogy a tollakat legnagyobb számban a fészkek alatt lehet megtalálni, ahol a tojók lényegesen több időt töltenek, mint a hímek. Utóbbiak főleg a fészkek közelében található kiülőfák környékén vedlenek, de ezeket a helyeket lényegesen kevesebb alkalommal vizsgáltuk át.

Az *ivarmeghatározáshoz* használt primerek és PCR-módszer parlagi sas esetében nagyon (gyakorlatilag 100%-ban) megbízható, és irodalmi adatok alapján további fajok esetében is könnyen alkalmazható módszert jelentenek.

Az általunk használt mikroszatellita markerek alkalmasak arra, hogy a populáció egyedeit hosszú távon nyomon kövessük, mortalitásukról, mozgásukról, territórium- és párhűségükről képet kapjunk. Ezen információk nagyban segíthetik a fokozottan védett faj megóvása érdekében tett természetvédelmi intézkedéseket, valamint új, máshogyan nem vizsgálható ökológiai és biológiai kérdésekre adhatnak válaszokat.

Az mtDNS-vizsgálatok eredményei alapján a vedlett tollakból sikeresen meghatározható az mtDNS kontrollrégió 345 bázispár hosszúságú szakaszának szekvenciája, és a 13 polimorf pozíció alapján az egyedek haplotípusa megadható. Eddigi tapasztalataink alapján a tollakból kivont DNS-mintáknál nagyobb valószínűséggel lesz sikeres a szekvencaanalízis, mint az IsoCode STIX™ papírból kinyert DNS-minták esetén. Ez azzal magyarázható, hogy a DNS-koncentráció, amitől leginkább függ a reakció sikeressége, az IsoCode STIX™ papírminták esetén kisebb a DNS-kivonásos protokoll után, mint a tollmintákban, valamint ezekben a mintákban nagyobb fehérjetartalmat mértünk, ami szintén gátolhatta a polimeráz láncreakciók sikerességét.

A mikroszatellita módszer az egyedazonosításban megbízható

A vizsgálatok populációdinamikai és viselkedésökológiai kérdéseket is tisztázhatnak

A nem invazív módon gyűjtött minták eredményes vizsgálhatósága új távlatokat nyit

Vizsgálataink bizonyították, hogy a tollakból történő mintavételi módszer, a minták megfelelő tárolása esetén, jól alkalmazható a kárpát-medencei parlagisas-populáció genetikai állapotának felmérésére és más populációkkal való kapcsolatainak felderítésére. Nagy anyagi befektetés nélkül a távoli populációk egyedeinek genetikai vizsgálata is lehetővé válik a terepen begyűjtött tollakból vett minták postázásával. Jelenleg is folyik a teljes hazai állományból 12 év alatt begyűjtött, mintegy háromezer tollminta, valamint a faj további elterjedési területén található, 11 országból begyűjtött minták kiválogatása és elemzése. A hatékony neminvazív mintavételi és több célú genetikai vizsgálati módszereknek köszönhetően már a közeljövőben elegendő minta állhat rendelkezésünkre ahhoz, hogy a veszélyeztetett faj védelme szempontjából fontos populációdinamikai és viselkedésökológiai kérdéseket megválaszolhassunk.

Az itt részletezett mintavételi módszerekkel nyert minták (a kis mennyiségű és részben degradálódott DNS-t tartalmazó vedlett tollak, továbbá a speciális tárolópapírra begyűjtött vércseppminták) éppúgy megfelelő DNS-forrást szolgáltatnak az általunk használt legtöbb genetikai vizsgálati módszerhez, mint a hagyományos destruktív vagy invazív módon begyűjtött szövet-, ill. vérminták. Megjegyezzük azonban, hogy a neminvazív módon gyűjtött, vedlett tollból kivont minták az mtDNS-analízisre alkalmasabbak voltak, mint a papírra vett vérminták, tehát ez a vizsgálat az állatok megszurása nélkül elvégezhető.

A leírt neminvazív módszerekkel bővül a lehetősége a genetikai vizsgálatok állatorvosi és állattenyésztési területen történő rutinszerű alkalmazásának. Egyszerűségüknek, valamint a mintavétellel járó minimális stressznek köszönhetően a mintavételt az állattartók is könnyen elvégezhetik, könnyítve ezzel a vizsgálattal járó logisztikát. Kialakult laboratóriumi rutin mellett, a részleges automatizálásnak köszönhetően, az egyes vizsgálatok gyorsan elvégezhetőek, és az így kapott, többnyire csak genetikai úton nyerhető adatok felhasználásával, a vizsgálatok gazdaságilag megtérülhetnek.

Köszönetnyilvánítás

A vizsgálatban felhasznált hazai vedlett parlagisas-tollakat a Magyar Madártani és Természetvédelmi Egyesület (MME) és a nemzeti parkok szakemberei által működtetett Parlagisas-védelmi Munkacsoport, míg a szlovákiai mintákat a Szlovák Ragadozómadár-védelmi Egyesület (RPS) tagjai gyűjtötték be.

Külön köszönettel tartozunk a SZIE-ÁOTK Zoológiai Intézet (DR. KABAI PÉTER és SCHROTT ANIKÓ), valamint az Országos Gyógyintézeti Központ Hematológiai és Immunológiai Intézet Molekuláris Biológiai Laboratórium munkatársainak (DR. TORDAI ATTILA, DR. ANDRIKOVICS HAJNALKA, BORS ANDRÁS, SZILVÁSI ANIKÓ és MEGGYESI NÓRA), valamint DR. HARNOS ANDREÁNAK és DR. ZÖLDÁG LÁSZLÓNAK, hogy segítettek a vizsgálat háttérének megteremtésében és a munkák során felmerült nehézségek leküzdésében. Köszönjük továbbá külföldi kollégáink HANA LATKOVA és MONIKA CHRENKOVA, valamint a parlagi sasok genetikai kutatásával foglalkozó BEGOÑA MARTÍNEZ-CRUZ, JUAN JOSÉ NEGRO, JOSÉ ANTONIO GODOY és JAMIE ANN RUDNICK együttműködését.

A laborvizsgálatokat és a tollak terepi begyűjtését az MME, az RPS, az Eötvös Loránd Tudományegyetem (ELTE) és a Magyar Természettudományi Múzeum (MTM) következő pályázatai finanszírozták 2002 és 2007 között: Európai Bizottság LIFE Nature programja (MME: LIFE02NAT/H/8627, RPS: LIFE03NAT/SK/00098), Környezetvédelmi és Vízügyi Minisztérium (ELTE: K-36-02-0005H, MME: K-36-03-00008T, K-36-04-00008L), Nemzeti Kutatási és Fejlesztési Programok – 2004 (MTM: NKFP3-3B023-04).

IRODALOM

1. ANGLEBY, H. – SAVOLAINEN, P.: Forensic informativity of domestic dog mtDNA control region sequences. *Forensic Sci. Int.*, 2005. 154. 99–110.
2. BOWLING, A. T.: Historical development and application of molecular genetic tests for horse identification and parentage control. *Livest. Prod. Sci.*, 2001. 72. 111–116.
3. BUSCH, J. D. – KATZNER, T. E. et al.: Tetranucleotide microsatellites for aquila and haliaetus eagles. *Mol. Ecol. Notes*, 2005. 5. 39–42.
4. CAI, X. – CHEN, H. et al.: mtDNA diversity and genetic lineages of eighteen cattle breeds from *Bos taurus* and *Bos indicus* in China. *Genetica*, 2007. 131. 175–183.
5. CHAMBERS, G. K. – MACAVOY, E. S.: Microsatellites: Consensus and controversy. *Comp. Biochem. Phys. Part B*, 2000. 126. 455–476.
6. CHEN, S-Y. – DUAN, Z-Y. et al.: Origin, genetic diversity, and population structure of Chinese domestic sheep. *Gene*, 2006. 376. 216–223.
7. CHEN, S-Y. – SÜ, Y-H. et al.: Mitochondrial diversity and phylogeographic structure of Chinese domestic goats. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 2005. 37. 804–814.

8. COYNE, S. R. – CRAW, P. D. et al.: Comparative analysis of the Schleicher and Schuell IsoCode Stix DNA isolation device and the Qiagen QIAamp DNA Mini Kit. *J. Clin. Microbiol.*, 2004. 42. 4859–4862.
9. DZIUK, P.: Positive, accurate animal identification. *Anim. Reprod. Sci.*, 2003. 79. 319–323.
10. FRIDOLFSSON, A. K. – ELLEGREN, H.: A simple and universal method for molecular sexing of non-ratite birds. *J. Avian Biol.*, 1999. 30. 116–121.
11. GEMMEL, N. – AKIYAMA, S.: An efficient method for the extraction of DNA from vertebrate tissue. *Trends Genet.*, 1998. 12. 338–339.
12. GODOY, J. A. – NEGRO, J. J. et al.: Phylogeography, genetic structure and diversity in the endangered bearded vulture (*Gypaetus barbatus*) as revealed by mitochondrial DNA. *Mol. Ecol.*, 2004. 13. 371–390.
13. GRIFFITHS, R. – TIWARI, B.: Sex of the last wild Spix's macaw. *Nature*, 1995. 375. 454.
14. HIPKISS, T. – HÖRNFELDT, B. et al.: Sex ratio and age structure of nomadic Tengmalm's owls: a molecular approach. *J. Avian Biol.*, 2002. 33. 107–110.
15. HORVÁTH, M. B. – MARTÍNEZ-CRUZ, B. et al.: An overlooked DNA source for non-invasive genetic analysis in birds. *J. Avian Biol.*, 2005. 36. 84–88.
16. JONES, K. L. – RODWELL, L. et al.: Genetic conservation of South African wattled cranes. *Biol. Conserv.*, 2006. 127. 98–106.
17. KATZNER, T. E. – BRAGIN, E. A. – MILNER-GULLAND, E. J.: Modelling populations of long-lived birds of prey for conservation: A study of imperial eagles (*Aquila heliaca*) in Kazakhstan. *Biol. Conserv.*, 2006. 132. 322–335.
18. LUKACS, P. M.: Statistical aspects of using genetic markers for individual identification in capture-recapture studies. Dissertation, Colorado State University, Department of Fishery and Wildlife Biology, Fort Collins, Colorado, USA, 2005. 26–70., 87–108.
19. MARTÍNEZ-CRUZ, B. – DAVID, V. et al.: Eighteen polymorphic microsatellite markers for the highly endangered Spanish imperial eagle (*Aquila adalberti*) and related species. *Mol. Ecol. Notes*, 2002. 2. 323–326.
20. MARTÍNEZ-CRUZ, B. – GODOY, J. A. – NEGRO, J. J.: Population genetics after fragmentation: the case of the endangered Spanish imperial eagle (*Aquila adalberti*). *Mol. Ecol.*, 2004. 13. 2243–2255.
21. NEI, M.: *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press. New York, 1987. 512
22. OAKENFULL, E. A. – LIM, H. N. – RYDER, O. A.: A survey of equid mitochondrial DNA: Implications for the evolution, genetic diversity and conservation of *Equus*. *Conserv. Gen.*, 2000. 1. 341–355.
23. RANNALA, B. – MOUNTAIN, J. L.: Detecting immigration by using multilocus genotypes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997. 94. 9197–9201.
24. RUDNICK, J. A. – KATZNER, T. E. et al.: Using naturally shed feathers for individual identification, genetic parentage analyses, and population monitoring in an endangered Eastern imperial eagle (*Aquila heliaca*) population from Kazakhstan. *Mol. Ecol.*, 2005. 14. 2959–2967.
25. SCHWARTZ, M. K. – LUIKART, G. – WAPLES, R. S.: Genetic monitoring as a promising tool for conservation and management. *Trends Ecol. Evol.*, 2006. 22. 25–33.
26. TABERLET, P. – LUIKART, G.: Noninvasive genetic sampling and individual identification. *Biol. J. Linn. Soc.*, 1999. 68. 41–55.
27. TABERLET, P. – WAITTS, L. P. – LUIKART, G.: Noninvasive genetic sampling: look before you leap. *Trends Ecol. Evol.*, 1999. 14. 323–327.
28. WAITS, L. P. – LUIKART, G. – TABERLET, P.: Estimating the probability of identity among genotypes in natural populations: cautions and guidelines. *Mol. Ecol.*, 2001. 10. 249–256.
29. ZSOLNAI A. – ANTON I. – FÉSZÜS L. – SZÁSZ F. – NÁNDORFI Z.: Madarak ivarmeghatározása molekuláris genetikai módszerrel. *Magy. Állatorv. Lapja*, 2003. 124. 281–284.

Közlésre érkezik: 2008. okt. 15.

■ HÍR

Szarvasmarhaembrió-átültetés számokban

A Nemzetközi Embrióátültetési Társasághoz befutó adatközlések szerint Európában évente mintegy 100 ezer szarvasmarha-embrió átültetése történik. A hazai adatok ehhez képest úgy aránylanak, ahogyan állatlét-számunk a kontinens szarvasmarhalétszámához.

A tavalyi évben itthon 35 tejhasznú donortól 279 embriót nyertek, ebből átültethető minőségű volt 183, a 71 húshasznú donor kimosásakor 904 embriót találtak meg, ebből átültethető minőségű volt 660.

A 2008. évben 139 embriószexálás történt. Az előző évhez képest jelentősen nőtt a beültetett embriók szá-

ma: „in vivo” friss embriót 274-et, élő donortól nyert, fagyasztott felolvasztott, embriót 588-at ültettek át. A kinyert és fel nem használt embriókból 211-et fagyasztottak le tartós tárolásra. 2008-ban a korábbi átültetések közül összesen 116 szarvasmarhautód született.

Más állatfajoknál az embrióátültetés aránya nagyságrenddel kisebb. 16 kanca esetében az embriógyűjtés 8 alkalommal volt sikeres, friss állapotban 7 lóembriót ültettek át.

Dr. Flink Ferenc
MgSzH Központ